



Title	JAM-Bと可溶性JAM-Cの細胞-基質間接着は脂肪由来幹細胞の維持に重要である(本文)
Author(s)	山崎, 森里生
Citation	
Issue Date	2018-03-21
URL	http://ir.fmu.ac.jp/dspace/handle/123456789/1407
Rights	This is the pre-peer reviewed Japanese version of "Biomedicines. 2021 Mar 10;9(3):278. doi: 10.3390/biomedicines9030278", used under CC BY 4.0
DOI	
Text Version	ETD

This document is downloaded at: 2023-05-05T12:12:48Z

JAM-Bと可溶性JAM-Cの細胞－基質間接着は
脂肪由来幹細胞の維持に重要である

医学研究科(平成26年度入学) 分子細胞病理学分野

学籍番号 145034

山崎 森里生

要旨

はじめに

脂肪由来幹細胞(ADSC)は採取しやすく様々な細胞系譜への分化能を保持していることから、再生医療における現実的な幹細胞リソースとして期待されている。しかしながらADSCにおいて自己複製能や分化能などの幹細胞性や増殖能がどのように制御されているかについては理解が進んでいない。本研究では、造血幹細胞や神経幹細胞など様々な組織幹細胞のマーカー分子としても知られるタイト結合膜貫通分子のJAMファミリー (JAMs)に着目し、マウスADSCおよび脂肪組織におけるJAMsの発現とその機能を明らかにした。

材料・方法

コラゲナーゼ処置による一般的な方法を用いて成体マウス的大腿部脂肪組織からADSCを単離培養し、半定量的RT-PCR, ウェスタンブロット, および免疫組織化学染色によりJAMsの発現を解析した。続いて成体マウス的大腿部脂肪組織の凍結切片を免疫組織化学染色してJAMsの分布を*in vivo*で明らかにした。次にADSCをJAMsのリコンビナント蛋白質(rJAMs)上で培養し、その接着や幹細胞性に与える影響を評価した。さらに免疫沈降法によってJAMsのリン酸化状態や蛋白質複合体形成を解析した。

結果

8種類あるマウスJAMsのうちJAM-BとJAM-CがADSCの細胞表面に発現していた。またJAM-B/Cは、ADSCの供給源であるマウス脂肪組織の間質血管細胞群(stromal vascular fraction; SVF)にも分布しており、さらにJAM-Cは切断されて可溶化体のsJAM-Cとして基質に沈着していた。またsJAM-Cに相当するリコンビナントJAM-C (rJAM-C)上でADSCを培養すると幹細胞マーカーの発現が亢進した。免疫沈降ではJAM-B/Cが活性化型Srcファミリーキナーゼ(pY416-SFK)と複合体を形成しており、またpY416-SFK 依存性にJAM-Bのみがリン酸化されることが明らかとなった。

考察

rJAM-Cを使用したsJAM-Cの模倣実験の結果から、脂肪組織の基質に分布するsJAM-Cは脂肪幹細胞の幹細胞性を維持するニッチとして機能している可能性が考えられた。また、JAM-BとJAM-Cが様々な細胞でヘテロフィリックな会合を形成することや、JAMsのリン酸化が上皮細胞の分化や恒常性維持に貢献していることが既に知られている。これらの事実と本研究から得られた結果を合わせると、SVFがsJAM-Cを産生して脂肪組織の間質に放出し、そこに沈着したsJAM-CとADSCに発現するJAM-Bとのヘテロフィリックな会合に端を発するシグナルが、ADSCの幹細胞性を制御していると考えられた。

結語

本研究により、sJAM-CとJAM-Bによる基質-細胞間接着がADSCの維持に重要なはたらきを担っていることが示された。基質-細胞間の異種JAM分子の会合は間葉性幹細胞の新たな制御機構として重要であるばかりでなく、他の様々な組織幹細胞ニッチに関する理解を広げる可能性がある。

緒言

間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells; MSCs)は様々な細胞への分化能を有し(Horwitz and Dominici, 2008; Chan et al., 2013), 傷害組織に遊走・集積するホーミング能力や, 種々の栄養因子産生を介する組織再生能力, 免疫抑制作用を併せ持つ(Uccelli et al., 2008)ことから, 細胞治療のツールとして期待されている. 実際, 重症心筋梗塞や肝硬変, 移植片対宿主病, クローン病, 多発性硬化症など多彩な疾患に対してMSCsを用いた治験が行われている(Le Blanc and Mougiakakos, 2012; Trounson and McDonald, 2015). MSCsは当初骨髄で同定された(Friedenstein et al., 1966)が, ほぼ全ての臓器の小血管周囲に存在すると考えられている(Sacchetti et al., 2007; Crisan et al., 2008; Uccelli et al., 2008). なかでも脂肪由来幹細胞(Adipose-derived stem cells; ADSC)は「脂肪組織の採取しやすさ」に加えて, 骨髄由来のMSCsと比較して500-1,000倍の細胞数が得られるという利点がある(Zuk et al., 2002; Fraser et al., 2006). またADSCは多くの幹細胞と異なり, 特殊な因子を加えることなく通常培地で安定して培養でき, FACSソーティングによる選別を必ずしも必要としないなど, 現実的な幹細胞リソースとしての有用性が大きい(Bunnell et al., 2008).

成体の脂肪組織は様々な細胞種によって構成されている. 成熟脂肪細胞は細胞質に巨大な脂肪滴を持ち直径100 μm を超える大型の細胞で, 体積としては脂肪組織の約90%を占めるが, 細胞数としては脂肪組織を構成する全細胞の半数に満たない(Yoshimura et al., 2006). 残りの半数以上は成熟脂肪細胞の間隙に分布する小動静脈と毛細血管の内皮・周皮・平滑筋細胞, ならびに未分化な間葉系前駆細胞などで占められ, これらを総称して間質血管細胞群(stromal vascular fraction; SVF)と呼ぶ. SVFは脂肪細胞の供給源となるとともに, 血管を構成する平滑筋や内皮細胞などに分化すると考えられている(Guimarães-Camboa et al., 2017). このSVFを分離培養するとによりADSCは得られる.

JAMファミリー分子(Junctional Adhesion Molecules; JAMs)はイムノグロブリンスーパーファミリーに属する細胞間接着分子であり, JAM-A (*Jam1*, *F11r*), JAM-B (VE-JAM, *Jam2*), JAM-C (*Jam3*), JAM4 (*Igsf5*), JAML (*Amical*), CAR (Coxsackie and Adenovirus receptor; *Cxadr*), CLMP (Coxsackie and Adenovirus receptor-like membrane protein; *Clmp*), およびESAM (endothelial cell-selective adhesion molecule; *Esam*)の8種類で構成される(Bazzoni, 2003; Ebnet et al., 2004; Chiba et al., 2008). これらは共通して細胞外に2つのIgG様ドメインを有する1回膜貫通型蛋白質で, 細胞外ドメインを介してホモフィリックまたはヘテロフィリックに会合する(Bazzoni, 2003; Ebnet et al., 2004; Weber et al., 2007). またJAMsは上皮細胞のみならず血球や間葉系の細胞系譜にも広く分布し, その多様な会合様式が異なる細胞種間での接着を可能にしている. 一方JAMsのC末端細胞内ドメインは, 複数の膜裏打ち分子との結合に必要な1つのPDZドメインを有するとともに, 各種シグナル分子との相互作用によってリン酸化等の翻訳後修飾を受ける(Ebnet, 2017). これらJAMsは多彩な機能を担っており, タイト結合形成を含む細胞間接着装置複合体の成熟, 極性形成, 細胞増殖, 細胞遊走および細胞死などを制御する(Ebnet, 2017). またJAMsは血管新生, 血球分化, 精子形成, ならびに中枢神経発生など様々な生命現象に貢献している.

造血幹細胞にもJAM-A, JAM-B, JAM-C, JAM4, およびESAMが発現しており(Nagamatsu et al., 2006; Arcangeli et al., 2011; Sugano et al., 2007; Arcangeli et al., 2014; Ooi et al., 2009), このうちJAM-Cは造血幹細胞の維持に必要であることが報告されている(Praetor et al., 2009). また造血幹細胞のJAM-Cは骨髄間質細胞に発現するJAM-Bとの間でヘテロフィリックに会合することによ

て、そのホーミングに寄与している(Arcangeli et al., 2014). さらにゼブラフィッシュを用いた研究により、造血幹細胞前駆細胞(hematopoietic precursor cells)にあたる外側板中胚葉細胞(posterior lateral mesoderm cells)と体節内間葉系細胞(somitic stromal cells)の間のJAM-AとJAM-Bによるヘテロフィリックな会合が、Notchシグナルの活性化を介して造血幹細胞の運命決定を担っていることがわかった(Kobayashi et al., 2014). 一方で神経幹細胞におけるJAM-BとJAM-C (Sakaguchi et al., 2006; Stelzer et al., 2012)をはじめ、JAMsは様々な幹細胞や前駆細胞にも発現している. しかしながら、造血幹細胞以外の幹細胞におけるJAMsの役割については全く解明されていない.

以上の背景から、本研究において私はJAMファミリー分子がSVFあるいはADSCの細胞機能、特に自己複製能や多分化能の維持を担っているという仮説をたて研究を進めた. マウス培養ADSCおよびマウス脂肪組織を分子生物学あるいは組織学的に解析することによって、JAM-B/CがADSCや脂肪組織に発現していることが解った. またJAM-Cの一部は細胞外ドメインの切断により可溶化されて細胞外基質に沈着し、基質-細胞間接着を介してADSCの細胞機能を制御している可能性が強く示唆された. すなわち細胞外基質に沈着する可溶性JAM-Cは、ADSCを制御するニッチとして機能すると考えられた.

材料と方法

抗体

免疫染色とウェスタンブロットには表1にある抗体を、アプリケーションに応じて同表に記載する希釈倍率で使用した。

マウスADSCの分離

マウスADSCの分離は一般的に用いられている確立された方法(Lin et al., 2008)に従い、福島県立医科大学動物実験委員会の承認を得て、福島県立医科大学動物実験規程を遵守して遂行した。8-12週齢にあるC57BL/6N系統の雄マウスから大腿部皮下脂肪組織を採取した後、PBSでよく洗浄しながら剪刀で細断し、0.075% Collagenase A (Roche)で37°C45分間振盪した。浮遊する脂肪組織塊を除去した後200Gで遠心分離することでSVFを単離し、 12×10^4 個の細胞を6 cm培養皿に播種した。

細胞培養

ADSCの培養は10%ウシ血清を添加したDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)を用いて行った。2日毎に培地交換し、50-70%の細胞密度に達した時点で0.25%トリプシン/1mM EDTA溶液を用いて剥離し、 2×10^5 個の細胞数を継代した。解析には3-5継代の細胞を使用した。継代による変化を評価する目的で図1Bのみ8継代の細胞を使用した。PP2 (Calbiochem)はDMSOに溶解し、播種翌日に1 μ Mの濃度で通常培地に添加した。

HEK293Tも同一の培地を用い、同様の方法で培養した。遺伝子導入はPEI: Polyethylenimine Max (コスモバイオ)により標準プロトコルを用いて行い、48時間後に細胞抽出物と培養上清を回収した。

発現ベクタープラスミド

RIKEN BioResource Centerより供与されたCSII-EF-Venusの多重クローニング部位(MCS)に、マウス腎臓から得たcDNAライブラリを鋳型としてPCRで増幅したマウスJAM-C (*Jam3*)を、ピューロマイシン耐性遺伝子と共にIn-Fusion® HD Cloning Kit (タカラバイオ)を用いた2フラグメント挿入法でクローニングした。プライマーはそれぞれ、*Jam3*の増幅には

5'-GAGAATTCTGCAGCGGCCGCCATGGCGCTGAGCCGGCGGCT-3'ならびに

5'-CTGCATAGTCCGGGACGTCATACGGATAGCCCGCATAGTCAGGAACATCGTATGGGTAGATAACAAAGGACGATTTGTGTC-3'を、ピューロマイシン耐性遺伝子の増幅には、

5'ATGACGTCCCGGACTATGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCCAGATTACGCTGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCA-3'ならびに

5'-GGGAGAGGGGCGGATCCTAGGCACCGGGCTTGCGGGTCAT-3'を用いた。

RNA抽出およびRT-PCR

RNA抽出とRT-PCRは過去に記載された一般的な方法を用いて行った(Sugimoto et al., 2013)。培養細胞からTRIzol Reagent (ambion)によりRNAを抽出し、PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ)を用いて逆転写反応を行ってcDNAライブラリを得た。半定量的PCRはGoTaq Green Master Mix Kit (Promega)を用い、表2に記載するプライマーによって標的配列を

増幅した. 2%アガロースゲルに泳動してエチジウムブロマイドで染色した後, CCDイメージャー Image Quant LAS4000 (GE Health care) で撮像した. その後ImageJ (National Institute of Health; NIH)を用いて目的とする分子量に相当する領域の輝度を定量して統計解析した.

ウエスタンブロット

ウエスタンブロットは過去に記載された一般的な方法を用いて行った(Sugimoto et al., 2013). 細胞抽出物の蛋白質サンプルにはRadio Immunoprecipitation assay (RIPA) Buffer (25 mM Tris-HCl pH7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) にタンパク質分解酵素阻害剤 (Complete mini EDTA-free; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 5 mM NaF, 1mM Na₃VO₄および1 mM Phenyl methanesulfonyl fluoride Solution (PMFS) を添加した可溶化液を用いた. 培養上清は冷却した10倍量の10%トリクロロ酢酸アセトン溶液により濃縮して使用した. SDS-PAGE, 転写, ならびに抗体反応を順に行い, ECL Prime (GE Healthcare)によって化学発光させ, CCDイメージャーImage Quant LAS4000 (GE Health care) を用いて撮像した.

免疫組織化学

免疫染色は以前記載した方法を用いた(Sugimoto et al., 2013). ADSCはコラーゲン Cellmatrix type I-A (新田ゼラチン)でコーティングしたガラスベースディッシュ(IWAKI)に細胞を播種して培養した後, 2%パラホルムアルデヒド (PFA)を10分間室温で処置することにより固定し, 0.1% Triton-Xを同様に10分間室温で処置して浸透した. 抗体の希釈にはSignal booster Immunostain Solution F (Beacle)を用い, Cellstain DAPI solution (DOJINDO) により封入した. マウス脂肪組織はティシュー・テック O.C.T. コンパウンド(フナコシ)を用いて凍結して薄切し, 培養細胞と同様に固定, 浸透, 染色, および封入を行った. 撮像には共焦点レーザー顕微鏡システム (オリンパスFV1000-D)を使用した.

細胞接着アッセイ

リコンビナント可溶化JAM-B/C (Sino Biological)とマウスIgG (GE)はそれぞれ20, 100, 500 ngの容量を50 μ lのPBSに希釈して96穴丸底プレートに処置し, 30°Cで12時間静置した. 陽性コントロールとして500 ngのコラーゲン Cellmatrix type I-A (新田ゼラチン)を同様に処置した. その後PBSで2回洗浄し, 10%ウシ血清アルブミン(BSA; 和光純薬)を100 μ l加えて37°Cで2時間静置してブロッキングした. PBSで2回洗浄後剥離したADSCを播種し, 37°CのCO₂インキュベーターで30分間培養した. その後培養上清を除去し, クリスタル紫で染色した後にPBSで10回洗浄した. 最後に50 μ lの5%SDSで溶解し, 560 nm長における吸光度を測定した.

細胞増殖アッセイ

12穴培養皿に4 \times 10⁴個の細胞を播種し, 24時間後に 最終濃度10 μ Mの5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU; #B-5002, Sigma-Aldrich)を2時間処置してから4%PFAで固定した. その後, 配布元が推奨する方法で染色し, 蛍光位相差顕微鏡(OLYMPUS IX71, OLYMPUS)とDP controllerで撮影した. BrdU陽性のパーティクルをDAPI陽性のそれで除算して増殖細胞数を求めた.

免疫沈降法

1 × 10⁷個程度の培養細胞を上記と同様の可溶化液で500 μlに溶解し, 15 μlのProtein A sepharose beads (GE Health care)またはProtein G sepharose beads (GE Healthcare)を加えて2時間4°Cで緩徐に攪拌した. 続いて遠心分離により上清を回収し, 2 μgの非特異的IgG (マウス; GE Health care, ラット; GE Health care, ヤギ; Dako)あるいは抗体を15 ulのsepharose beadsと共に加えて12時間4°Cで緩徐に攪拌した. 遠心分離によりsepharose beadsを沈殿させ可溶化液で洗浄することを3回繰り返した後, ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)と2-メルカプトエタノールを含むSDS-PAGE用ローディングバッファーを加えて煮沸することにより, 蛋白質を還元してsepharose beadsから剥離すると共に変性, 直鎖化した. 最後に遠心分離によってsepharose beadsを除去し, ウェスタンブロットで検出した. なお沈降に用いる抗体がヒツジの場合にのみProtein G sepharose beadsを, それ以外の場合にはProtein A sepharose beadsを用いた.

結果

培養ADSCの細胞膜上にはJAM-B/Cが発現している

8種類のJAMファミリー分子のうちどのサブタイプが培養ADSCに発現しているかを明らかにするために、私はまず半定量的RT-PCR法によりJAMs遺伝子の発現を評価した(図1A). その結果、ADSCにはJAM-A, JAM-B, JAM-C, CAR, およびCLMPがmRNAレベルで発現していることがわかった. 一方JAM4, JAML, ESAM mRNAの発現は見られなかった. そこで次に、ADSCで遺伝子発現が認められた5種類のJAM分子についてウェスタンブロット法を施行した. 図1Bに示す通り、JAM-B, JAM-C, およびCLMP蛋白質はADSCに強く発現していた. 一方CAR蛋白質の発現は弱く、JAM-A蛋白質の発現は検出されなかった. またJAM-BおよびJAM-Cは継代を経ても蛋白質発現が保たれていたが、CLMPは継代に伴ってその発現量が減少していた. そこで蛋白質レベルで強い発現を認めたJAM-B, JAM-C, およびCLMPについて、細胞内局在を免疫染色法によって観察した. JAM-BとJAM-CがADSCの細胞膜上に分布する一方、CLMPは細胞質に広く陽性であった(図1C). またJAM-BとJAM-Cの少なくとも一部は共局在しており、ADSCの細胞膜上でZO-1とともに集積像が認められた(図1D).

JAM-Cは脂肪組織間質の細胞外基質に沈着している

続いて成体マウス脂肪組織におけるJAM-BとJAM-Cの免疫染色を行い、特にADSCが由来するSVFでの分布に着目した. その結果既に報告されているように(Ebnet, 2017), JAM-B/Cは血管内皮細胞や血管平滑筋細胞に陽性で、JAM-Cは末梢神経のシュワン細胞でも明瞭な染色像が観察された(data not shown). 加えてJAM-Cは脂肪組織間質にびまん性の陽性像を認めた(図2A). 続いてJAM-BとJAM-Cがどのような細胞あるいは構造に分布するのか検証するため、様々なマーカー分子との二重免疫染色を行った. まずJAM-B/CとZO-1, およびJAM-Cとクローディン-5(CLDN5)の共染色を行ったところ、これらの分子は脂肪細胞の間隙に網状に分布する小血管で共に発現していた. またJAM-Cは血管周囲の広い領域でZO-1やCLDN5と共局在を示さずに分布していた(図2B). その一方でJAM-B/C陽性シグナルの大部分は、脂肪細胞の細胞膜を標識するPerilipinと共局在しなかった(図2C). 次に脂肪組織の細胞外基質マーカーであるIII型コラーゲン(Macarak et al., J Histochem Cytochem, 1986)およびヘパラン硫酸糖鎖(HSPG)との共染色を試行した. その結果、III型コラーゲン陽性領域の殆どでJAM-Cの共局在が認められたのに対し、III型コラーゲンとJAM-Bの共局在は殆ど見られなかった(図2D). またHSPG陽性領域の大部分でもJAM-Cの共局在が認められた. 以上よりJAM-Cは成体マウス脂肪組織において、脂肪細胞同士の間隙に分布する細胞外基質にも分布することがわかった.

JAM-Cの細胞外ドメインは切断され脂肪組織間質に沈着する

JAMファミリー分子のうちJAM-A/CとCARは細胞外ドメインの基部で切断により可溶化されて細胞外に放出されることが知られている(Koenen et al., 2009; Rabquer et al., 2010; Houri et al., 2013). そこで培養ADSCや脂肪組織において、JAM-B/Cが同様に切断され可溶化されているかどうかを検討した. まず培養ADSCの細胞抽出物とその培養上清をウェスタンブロットに供したところ、JAM-Bは細胞抽出物のみで全長に一致する分子が検出されたが、培養上清中には認められなかった(図3A上). それに対してJAM-Cでは細胞抽出物で全長の約38 kDの分子が検出された

のに加えて、培養上清で約28 kDの短い分子が検出された(図3A下). このことから、JAM-Cが可溶性の分子(sJAM-C)として培養液中に放出されていることが明らかになった.

そこで、これまで使用してきたJAM-B/CのN末端を認識する抗体(抗JAM-B(N)抗体および抗JAM-C(N)抗体)に加えて、JAM-CのC末端を抗原とする別の抗体(抗JAM-C(C)抗体)を用いて、マウス脾臓・脂肪組織のウエスタンブロットを施行した. その結果sJAM-Bは検出されず、両組織においてもJAM-Bの細胞外ドメインは切断されないと考えられた(図3B上). その一方でsJAM-Cに相当する低分子量のシグナルは脾臓・脂肪組織において抗JAM-C(N)抗体で検出され、抗JAM-C(C)抗体では検出されなかった(図3B下). さらにC末端にHAタグを付加したJAM-C (*Jam3-HA*)をHEK293T細胞に一過性発現させ、同様に細胞抽出物と培養上清をウエスタンブロットに供した. その結果抗JAM-C(N)抗体はこれまでと同様にfJAM-CとsJAM-Cの両方を認識したが、抗HA抗体ではfJAM-Cのみが標識された(図3C). したがってsJAM-CはJAM-Cの細胞外ドメインであり、切断により放出される可溶化体として矛盾しないことが示された. さらに抗JAM-C(N)抗体と抗JAM-C(C)抗体による二重免疫染色では、脂肪間質の小型円形細胞の細胞膜または細胞質の少なくとも一部がJAM-CのN末およびC末抗体で共陽性像を示した. 一方N末抗体による免疫で見られる細胞外基質における広い陽性像は、C末抗体では認めなかった (図3D). これらの結果より、JAM-Cは細胞外ドメインの膜貫通部近傍で切断をうけて可溶性のsJAM-Cとして放出され、それが脂肪組織の細胞外基質に沈着することが明らかとなった.

sJAM-Cは培養ADSCのニッチとして機能している

次に基質に沈着したsJAM-CがADSCと接着し、幹細胞ニッチとして機能するかどうかを検討した. まずリコンビナント可溶性JAM-B/C (rJAM-B/C)とADSCの接着性を評価した. IgGをコントロールとしてrJAM-B/Cをプラスチック培養皿に塗布したのち、ADSCを加えて30分後の接着細胞数をクリスタルバイオレッド染色により計測したところ、rJAM-Cでは20, 100, 500 ngで接着が有意に亢進していた. 一方rJAM-Bでは最も高用量の500 ngの場合のみで有意な接着細胞数の上昇を認めた(図4A). 以上より細胞外のrJAM-CがADSCと強く結合することが示された. 次にrJAM-B/Cで被覆した培養皿でADSCを培養し、幹細胞マーカーである*Klf4*, *Nanog*, *c-Myc*, および*Sox2*の発現を半定量的RT-PCRで評価した. その結果検討した4種類全ての幹細胞マーカーの発現が、rJAM-C上で培養したADSCにおいて有意に亢進していた(図4B). rJAM-Bも4種類の幹細胞マーカーのうち*c-Myc*と*Sox2*の発現を上昇させたが、その誘導はrJAM-Cに比べて弱かった. 次にrJAM-B/Cで被覆した培養皿でADSCを培養し、BrdUにより増殖期にある細胞の核を標識し、DAPI陽性細胞数で除して細胞増殖を評価した. その結果rJAM-C上で培養したADSCにおいて増殖能が約2倍程度と有意に亢進していた(図4C). 以上の結果により、基質に沈着したsJAM-Cが幹細胞ニッチとして機能し、ADSCの維持に貢献していることが明らかとなった.

培養ADSCのJAM-BはSFKによりチロシンリン酸化される

カドヘリンやインテグリン等の細胞接着分子が会合するとSrcファミリーキナーゼ(SFKs)が活性化され、細胞接着分子の細胞内ドメインをチロシンリン酸化する(Calautti et al., 1998; Qi et al., 2005; McLachlan et al., 2007; Canel et al., 2013). そこでADSCにおけるJAM-B/Cの会合によっても同様に、細胞内ドメインがチロシンリン酸化されるという仮説を立てた. この仮説を検証するため、まずADSCの細胞抽出物に対しリン酸化チロシン抗体を用いて免疫沈降を行い、ウエスタンブロットでJAM-B/Cを検出した. その結果JAM-Bのみがチロシンリン酸化されていることがわかった(図5A). 次にSFKsの特異的阻害剤であるPP2をADSCに処置し、同様に免疫沈降とウエスタンブロットを行った. その結果、ADSCにおけるJAM-Bのチロシンリン酸化シグナルはPP2処置により消失した(図5B). よってJAM-B/Cの細胞内ドメインのうち、JAM-BのみがSFKsによってチロシンリン酸化されて

いる可能性が強く示唆された。そこでJAM-Bが活性型の416チロシンリン酸化型SFK (pY416-SFKs)と複合体を形成するかどうか検討するため、抗JAM-B/C抗体によってADSCの細胞抽出物を免疫沈降し、抗pY416-SFKs抗体を用いてウェスタンブロットを行った。これらの結果から、JAM-B/CはpY416-SFKsと結合して蛋白質複合体を形成するが、このうちJAM-BのみがSFKsによってチロシンリン酸化されることがわかった(図5C)。

考察

今回私はまず、8種類のJAMファミリー分子のうちJAM-BとJAM-Cが培養ADSCの細胞表面に発現していることを見出した。またJAM-B/Cの少なくとも一部が細胞表面でZO-1と共局在していたことは、JAM-B/CがPDZドメインを介してZO-1と複合体を形成するという過去の報告(Ebnet et al., 2003)と合致する。一方CLMPはADSCの細胞質に広く陽性シグナルを認め、細胞表面には局在していなかった。またJAM4, JAML, ESAM mRNAやJAM-A蛋白質の発現は見られず、CAR蛋白質は弱く発現するのみであった。JAM-B/Cは造血幹細胞および神経幹細胞でも発現することが報告されている(Zhang et al., 2003; Sakaguchi et al., 2006; Stelzer et al., 2012; Arcangeli et al., 2014)。したがって、少なくとも3種類の組織幹細胞においてJAM-B/Cが共発現することが明らかになった。

第二の結論は、培養ADSCやマウス組織においてJAM-Cの細胞外ドメインが切断され、可溶性JAM-Cとして放出されることである。この結論は以下の結果から導き出された；1) JAM-CのN末を認識する抗体を用いたウエスタンブロットによって、sJAM-Cに相当する28 kDの分子が培養ADSCの培養上清や脂肪組織および脾臓に検出された、2) JAM-CのC末抗体を用いた脂肪・脾臓組織のウエスタンブロットでは、sJAM-Cに相当するシグナルが認められなかった、3) 細胞内ドメインであるC末端にHAタグを融合したJAM-Cの過剰発現系では、HA抗体が28 kDのフラグメントを認識せずfJAM-Cのみが検出された。ところで「JAMファミリー分子の細胞外ドメインの切断」は、血管内皮培養細胞におけるJAM-A (Koenen et al., 2009; Haarmann et al., 2010)およびJAM-C (Rabquer et al., 2010)、神経膠芽腫培養細胞におけるCAR (Houri et al., 2013)でも報告されている。このようなJAMファミリー分子の切断は、組織幹細胞や組織レベルでも惹起されることが今回示された。

脂肪組織の免疫染色では、JAM-Cは血管内皮マーカーであるCLDN5およびZO-1と共局在を示すのみならず、網状の微小血管周囲に広く観察された。加えて、JAM-CはIII型コラーゲンおよびHSPGと共局在しており、脂肪組織間質の細胞外基質に沈着していることが強く示唆された。また脂肪組織間質におけるJAM-Cのびまん性陽性像はN末認識抗体でのみ認められ、C末認識抗体では見られなかった。このことから、脂肪組織間質に沈着しているJAM-CはsJAM-Cであることが明らかになった。JAM-Cの細胞外沈着は角膜縁の上皮下基質でも報告されている(Polisetti et al., 2010)。脂肪組織と角膜縁組織はともにIII型コラーゲンからなる細網線維に富み(Macarac et al., 1986; White et al., 1997)、この2つの組織においてJAM-Cの細胞外沈着が認められることは興味深い。III型コラーゲンで構成される細網線維は骨髄、リンパ節、脾臓でも豊富に分布する(Macarac et al., J Histochem Cytochem, 1986)ことから、JAM-Cはこれら組織の間質にも沈着している可能性も考えられる。実際、sJAM-Cが脾臓に認められた今回のウエスタンブロットの結果はこの考えを支持している。

JAM-B/Cの細胞外ドメインに相当するrJAM-B/Cを用いた接着アッセイでは、ADSCがrJAM-Cとより強く結合することが明らかになった。特筆すべきことに、rJAM-C上で培養したADSCでは幹細胞マーカーの発現が顕著に上昇したことに加えて、増殖能も有意に亢進していた。以上の結果から、細胞外のsJAM-CはADSCの幹細胞形質を維持していることが強く示唆された。またrJAM-Cを利用したADSCの新規培養系は、「生体内のADSCとニッチ基質の関係を模倣したもの」と考えられ、この系を用いればこれまで見逃されてきた新たなMSC陽性マーカーを探索できる可能性がある。さらにsJAM-Cが脂肪組織以外の間質にも沈着しているならば、様々な組織幹細胞のニッチとして機能しているかもしれない。

ADSCを用いた免疫沈降の結果では、JAM-B/Cが活性型SFKsと複合体を形成するものの、このうちJAM-BのみがSFKsによってチロシンリン酸化されることを見出した。rJAM-CがADSCの接着能や幹細胞能を著しく増強することを考え合わせると、基質-ADSC間のrJAM-CとJAM-Bの会合がout-side-in signalを惹起し、JAM-BがSFKsによってチロシンリン酸化されることが示唆された。今後rJAM-Cを用いた免疫沈降を行い、この推論を検証する予定である。JAM-BとJAM-Cのヘテロフィリックな結合はホモフィリックな結合よりも強いという過去の報告(Lamagna et al., 2005; Powell and Wright, 2011; Arcangeli et al., 2012)を鑑みても、基質-ADSC間のrJAM-CとJAM-Bの会合様式は妥当である。一方Ichikawa-Tomikawaらは最近、タイト結合膜貫通分子クローディン-6の会合がそのC末細胞内ドメインにSFKsを直接リクルートすること、脊椎動物間で保存された4つのC末内チロシン残基のうち2つがチロシンリン酸化されることを突き止めている (unpublished data)。興味深いことに、JAM-BのC末細胞内ドメインでも260Yと266Yが脊椎動物間で保存されていることから (unpublished)、これらの一方あるいは両方がSFKsをリクルートする足場として機能してチロシンリン酸化を受ける可能性が考えられる。今後これらのチロシン残基をアラニン残基に置換した変異JAM-Bを構築し、この推論を検証する予定である。

ADSCと脂肪組織を用いた本研究により、私は以下のようなMSCsの新規制御機構を提唱したい (図6); 1) ADSCは細胞表面にJAM-B/Cを発現しており、このうちJAM-Cは細胞外ドメインの基部で切断されて可溶化体sJAM-Cとして放出され細胞外基質に沈着する、2) sJAM-CはADSCのニッチ基質として機能し、ADSCのJAM-Bと会合することでSFKsがリクルートされる、3) JAM-Bと結合したSFKsは活性化してJAM-Bをリン酸化するとともに、さらに下流へとシグナルを伝達してADSCの幹細胞性を維持する。MSCsがほぼ全ての臓器の小血管周囲に存在する(Sacchetti et al., 2007; Crisan et al., 2008; Uccelli et al., 2008)理由の一端は、血管内皮・平滑筋細胞に発現するJAM-Cも細胞外ドメイン切断を受けてニッチ基質を形成しているという仮説で説明し得るかもしれない。sJAM-Cが脂肪組織間質の微小血管周囲に分布する今回の免疫染色像や、sJAM-Cが血管内皮培養細胞から放出される過去の報告(Rabquer et al., 2010)はこの考えを支持している。本研究によって得られた知見は、MSCsの新たな制御機構を提唱するものであると同時に、他の様々な組織幹細胞でのニッチによる細胞制御機構の理解を広げる足がかりとなるであろう。さらにJAM-BとsJAM-Cの細胞-基質間接着を起点としたシグナルはがん幹細胞の維持にも貢献しているかもしれない。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、指導教官として実験計画から日々の実験方法にいたるまで終始丁寧なご指導、ご助言を賜りました福島県立医科大学基礎病理学講座、千葉英樹教授、杉本幸太郎学内講師に深厚なる誠意を表します。さらに、実験計画から実験方法にいたるまで懇切丁寧に御指導、御助言を頂きました同講座の富川直樹講師、東智仁学内講師、東淳子助教、齋藤明助教、井村徹也京都府立医科大学病理学教室人体病理学部門准教授、穂積あゆみ主任医療技師、三浦富子主任医療技師に深く感謝いたします。さらに、博士課程への進学および研究全般にわたる多大なご支援とご指導を賜りました歯科口腔外科の長谷川博准教授に深謝いたします。

最後に、共に励まし合い、辛くも楽しい時間を共に過ごした大学院生諸氏、実験遂行にサポートを頂いた MD-PhD コースの学生達に深い感謝の意を表して謝辞と致します。

引用文献

1. Arcangeli, M.-L., F. Bardin, V. Frontera, G. Bidaut, E. Obrados, R.H. Adams, C. Chabannon, and M. Aurrand-Lions. 2014. Function of Jam-B/Jam-C Interaction in Homing and Mobilization of Human and Mouse Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Stem Cells*. 32:1043–1054. doi:10.1002/stem.1624.
2. Arcangeli, M.-L., V. Frontera, F. Bardin, E. Obrados, S. Adams, C. Chabannon, C. Schiff, S.J.C. Mancini, R.H. Adams, and M. Aurrand-Lions. 2011. JAM-B regulates maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow. *Blood*. 118:4609–4619. doi:10.1182/blood-2010-12-323972.
3. Arcangeli, M.-L., V. Frontera, F. Bardin, J. Thomassin, B. Chetaille, S. Adams, R.H. Adams, and M. Aurrand-Lions. 2012. The Junctional Adhesion Molecule-B regulates JAM-C-dependent melanoma cell metastasis. *FEBS Lett*. 586:4046–4051. doi:10.1016/j.febslet.2012.10.005.
4. Bazzoni, G. 2003. The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol*. 15:525–530. doi:10.1016/S0955-0674(03)00104-2.
5. Le Blanc, K., and D. Mougiakakos. 2012. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat. Rev. Immunol*. 12:383–396. doi:10.1038/nri3209.
6. Bunnell, B.A., M. Flaata, C. Gagliardi, B. Patel, and C. Ripoll. 2008. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 45:115–20. doi:10.1016/j.ymeth.2008.03.006.
7. Calautti, E., S. Cabodi, P.L. Stein, M. Hatzfeld, N. Kedersha, and G. Paolo Dotto. 1998. Tyrosine phosphorylation and src family kinases control keratinocyte cell-cell adhesion. *J. Cell Biol*. 141:1449–65.
8. Chan, C.K.F., P. Lindau, W. Jiang, J.Y. Chen, L.F. Zhang, C.-C. Chen, J. Seita, D. Sahoo, J.-B. Kim, A. Lee, S. Park, D. Nag, Y. Gong, S. Kulkarni, C.A. Luppen, A.A. Theologis, D.C. Wan, A. DeBoer, E.Y. Seo, J.D. Vincent-Tompkins, K. Loh, G.G. Walmsley, D.L. Kraft, J.C. Wu, M.T. Longaker, and I.L. Weissman. 2013. Clonal precursor of bone, cartilage, and hematopoietic niche stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 110:12643–8. doi:10.1073/pnas.1310212110.
9. Chiba, H., M. Osanai, M. Murata, T. Kojima, and N. Sawada. 2008. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr*. 1778:588–600. doi:10.1016/j.bbamem.2007.08.017.
10. Crisan, M., S. Yap, L. Casteilla, C.W. Chen, M. Corselli, T.S. Park, G. Andriolo, B. Sun, B. Zheng, L. Zhang, C. Norotte, P.N. Teng, J. Traas, R. Schugar, B.M. Deasy, S. Badyrak, H.J. Buhring, J.P. Giacobino, L. Lazzari, J. Huard, and B. Péault. 2008. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell*. 3:301–313. doi:10.1016/j.stem.2008.07.003.
11. Ebnet, K. 2017. Junctional Adhesion Molecules (JAMs): Cell Adhesion Receptors With Pleiotropic Functions in Cell Physiology and Development. *Physiol. Rev*. 97:1529–1554. doi:10.1152/physrev.00004.2017.
12. Ebnet, K., A. Suzuki, S. Ohno, and D. Vestweber. 2004. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J. Cell Sci*. 117:19–29. doi:10.1242/jcs.00930.
13. Fraser, J.K., I. Wulur, Z. Alfonso, and M.H. Hedrick. 2006. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*. 24:150–154. doi:10.1016/j.tibtech.2006.01.010.
14. Friedenstein, A.J., I.I. Piatetzky-Shapiro, and K. V. Petrakova. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Development*. 16.
15. Guimarães-Camboa, N., P. Cattaneo, Y. Sun, T. Moore-Morris, Y. Gu, N.D. Dalton, E. Rockenstein, E. Masliah, K.L. Peterson, W.B. Stallcup, J. Chen, and S.M. Evans. 2017. Pericytes of Multiple Organs Do Not Behave as Mesenchymal Stem Cells In Vivo. *Cell Stem Cell*. 20:345–359.e5. doi:10.1016/j.stem.2016.12.006.

16. Haarmann, A., A. Deiss, J. Prochaska, C. Foerch, B. Weksler, I. Romero, P.-O. Couraud, G. Stoll, P. Rieckmann, and M. Buttmann. 2010. Evaluation of soluble junctional adhesion molecule-A as a biomarker of human brain endothelial barrier breakdown. *PLoS One*. 5:e13568. doi:10.1371/journal.pone.0013568.
17. Horwitz, E.M., and M. Dominici. 2008. How do mesenchymal stromal cells exert their therapeutic benefit? *Cytotherapy*. 10:771–4. doi:10.1080/14653240802618085.
18. Houri, N., K.-C. Huang, and J. Nalbantoglu. 2013. The Coxsackievirus and Adenovirus Receptor (CAR) Undergoes Ectodomain Shedding and Regulated Intramembrane Proteolysis (RIP). *PLoS One*. 8:e73296. doi:10.1371/journal.pone.0073296.
19. Kobayashi, I., J. Kobayashi-Sun, A.D. Kim, C. Pouget, N. Fujita, T. Suda, and D. Traver. 2014. Jam1a–Jam2a interactions regulate haematopoietic stem cell fate through Notch signalling. *Nature*. 512:319–323. doi:10.1038/nature13623.
20. Koenen, R.R., J. Pruessmeyer, O. Soehnlein, L. Fraemohs, A. Zerneck, N. Schwarz, K. Reiss, A. Sarabi, L. Lindbom, T.M. Hackeng, C. Weber, and A. Ludwig. 2009. Regulated release and functional modulation of junctional adhesion molecule A by disintegrin metalloproteinases. *Blood*. 113:4799–4809. doi:10.1182/blood-2008-04-152330.
21. Lamagna, C., P. Meda, G. Mandicourt, J. Brown, R.J.C. Gilbert, E.Y. Jones, F. Kiefer, P. Ruga, B.A. Imhof, and M. Aurrand-Lions. 2005. Dual Interaction of JAM-C with JAM-B and M2 Integrin: Function in Junctional Complexes and Leukocyte Adhesion. *Mol. Biol. Cell*. 16:4992–5003. doi:10.1091/mbc.E05-04-0310.
22. Lin, G., M. Garcia, H. Ning, L. Banie, Y.-L. Guo, T.F. Lue, and C.-S. Lin. 2008. Defining Stem and Progenitor Cells within Adipose Tissue. *Stem Cells Dev*. 17:1053–1063. doi:10.1089/scd.2008.0117.
23. Macarak, E.J., P.S. Howard, and E.T. Lally. 1986. Production and characterization of a monoclonal antibody to human type III collagen. *J. Histochem. Cytochem*. 34:1003–1011. doi:10.1177/34.8.2426330.
24. Nagamatsu, G., M. Ohmura, T. Mizukami, I. Hamaguchi, S. Hirabayashi, S. Yoshida, Y. Hata, T. Suda, and K. Ohbo. 2006. A CTX family cell adhesion molecule, JAM4, is expressed in stem cell and progenitor cell populations of both male germ cell and hematopoietic cell lineages. *Mol. Cell. Biol*. 26:8498–506. doi:10.1128/MCB.01502-06.
25. Ooi, A.G.L., H. Karsunky, R. Majeti, S. Butz, D. Vestweber, T. Ishida, T. Quertermous, I.L. Weissman, and E.C. Forsberg. 2009. The Adhesion Molecule Esam1 Is a Novel Hematopoietic Stem Cell Marker. *Stem Cells*. 27:653–661. doi:10.1634/stemcells.2008-0824.
26. Polisetti, N., V.G. Chaitanya, P.P. Babu, and G.K. Vemuganti. 2010. Isolation, characterization and differentiation potential of rat bone marrow stromal cells. *Neurol. India*. 58:201–8. doi:10.4103/0028-3886.63789.
27. Powell, G.T., and G.J. Wright. 2011. Jamb and Jamc Are Essential for Vertebrate Myocyte Fusion. *PLoS Biol*. 9:e1001216. doi:10.1371/journal.pbio.1001216.
28. Praetor, A., J.M. McBride, H. Chiu, L. Rangell, L. Cabote, W.P. Lee, J. Cupp, D.M. Danilenko, and S. Fong. 2009. Genetic deletion of JAM-C reveals a role in myeloid progenitor generation. *Blood*. 113:1919–28. doi:10.1182/blood-2008-06-159574.
29. Qi, J., J. Wang, O. Romanyuk, and C.-H. Siu. 2005. Involvement of Src Family Kinases in N-Cadherin Phosphorylation and beta-Catenin Dissociation during Transendothelial Migration of Melanoma Cells. *Mol. Biol. Cell*. 17:1261–1272. doi:10.1091/mbc.E05-10-0927.
30. Rabquer, B.J., M.A. Amin, N. Teegala, M.K. Shaheen, P.-S. Tsou, J.H. Ruth, C.A. Lesch, B.A. Imhof, and A.E. Koch. 2010. Junctional adhesion molecule-C is a soluble mediator of angiogenesis. *J. Immunol*. 185:1777–85. doi:10.4049/jimmunol.1000556.
31. Sacchetti, B., A. Funari, S. Michienzi, S. Di Cesare, S. Piersanti, I. Saggio, E. Tagliafico, S. Ferrari, P.G. Robey, M. Riminucci, and P. Bianco. 2007. Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. *Cell*. 131:324–336. doi:10.1016/j.cell.2007.08.025.

32. Sakaguchi, T., M. Nishimoto, S. Miyagi, A. Iwama, Y. Morita, N. Iwamori, H. Nakauchi, H. Kiyonari, M. Muramatsu, and A. Okuda. 2006. Putative "Stemness" Gene Jam-B Is Not Required for Maintenance of Stem Cell State in Embryonic, Neural, or Hematopoietic Stem Cells. *Mol. Cell. Biol.* 26:6557–6570. doi:10.1128/MCB.00729-06.
33. Stelzer, S., M.M.A. Worlitzer, L. Bahnassawy, K. Hemmer, K. Rugani, I. Werthschulte, A.-L. Schön, B.F. Brinkmann, E.C. Bunk, T. Palm, K. Ebnet, and J.C. Schwamborn. 2012. JAM-C is an Apical Surface Marker for Neural Stem Cells. *Stem Cells Dev.* 21:757–766. doi:10.1089/scd.2011.0274.
34. Sugano, Y., M. Takeuchi, A. Hirata, H. Matsushita, T. Kitamura, M. Tanaka, and A. Miyajima. 2007. Junctional adhesion molecule-A, JAM-A, is a novel cell-surface marker for long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood.* 111:1167–1172. doi:10.1182/blood-2007-03-081554.
35. Sugimoto, K., N. Ichikawa-Tomikawa, S. Satohisa, Y. Akashi, R. Kanai, T. Saito, N. Sawada, and H. Chiba. 2013. The tight-junction protein claudin-6 induces epithelial differentiation from mouse F9 and embryonic stem cells. *PLoS One.* 8:e75106. doi:10.1371/journal.pone.0075106.
36. Trounson, A., and C. McDonald. 2015. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell.* 17:11–22. doi:10.1016/j.stem.2015.06.007.
37. Uccelli, A., L. Moretta, and V. Pistoia. 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 8:726–736. doi:10.1038/nri2395.
38. Weber, C., L. Fraemohs, and E. Dejana. 2007. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 7:467–477. doi:10.1038/nri2096.
39. White, J., J.A. Werkmeister, J.A. Ramshaw, and D.E. Birk. 1997. Organization of fibrillar collagen in the human and bovine cornea: collagen types V and III. *Connect. Tissue Res.* 36:165–74.
40. Yoshimura, K., T. Shigeura, D. Matsumoto, T. Sato, Y. Takaki, E. Aiba-Kojima, K. Sato, K. Inoue, T. Nagase, I. Koshima, and K. Gonda. 2006. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J. Cell. Physiol.* 208:64–76. doi:10.1002/jcp.20636.
41. Zhang, J., C. Niu, L. Ye, H. Huang, X. He, W.-G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson, J.Q. Feng, S. Harris, L.M. Wiedemann, Y. Mishina, and L. Li. 2003. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 425:836–841. doi:10.1038/nature02041.
42. Zuk, P.A., M. Zhu, P. Ashjian, D.A. De Ugarte, J.I. Huang, H. Mizuno, Z.C. Alfonso, J.K. Fraser, P. Benhaim, and M.H. Hedrick. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 13:4279–4295. doi:10.1091/mbc.E02-02-0105.

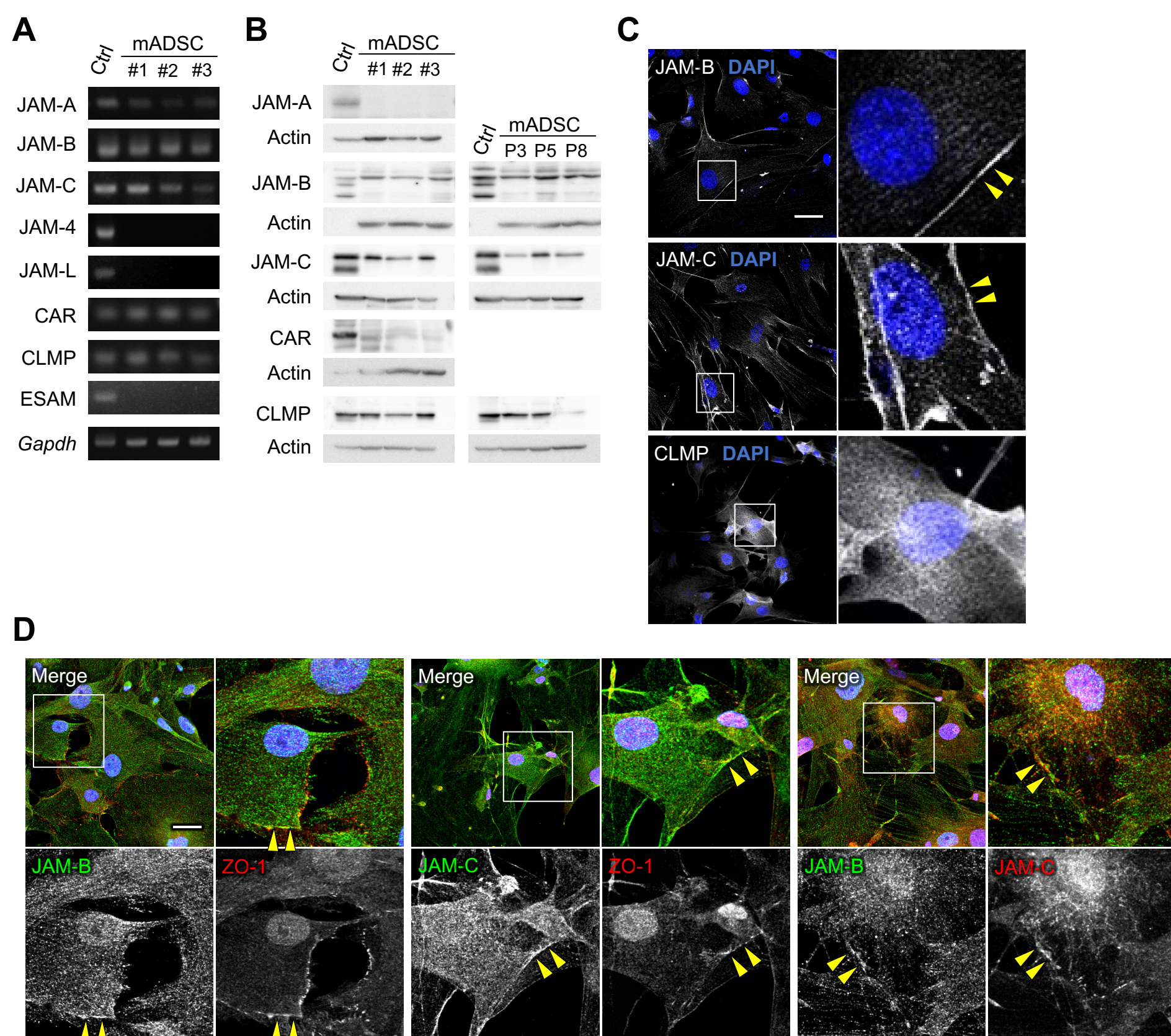


図1. JAM-B/CはマウスADSCの細胞表面に発現している

(A) 半定量的RT-PCRにより，ADSCにおけるJAMファミリー分子の発現を解析した．独立して3回施行した結果の代表例を提示する．#1, #2, #3は3匹の異なるマウスから得たADSCを示している．陽性コントロール (Ctrl) として，JAM4のマウス腎臓を除いて，マウス脾臓を用いた．(B) ウェスタンブロットによるJAMsの発現解析．P3, P5, P8はそれぞれ第3継代，第5継代，および第8継代のADSCを示す．陽性コントロール (Ctrl) として，JAM-Aにマウス腎臓，JAM-Bにマウス心臓，JAM-Cにマウス脾臓，CARにマウス嗅球，CLMPにマウス小腸をそれぞれ用いた．(C) 免疫染色法によりADSCにおけるJAM-B, JAM-C, およびCLMPの細胞内局在を解析した．(D) JAM-BとZO-1, JAM-CとZO-1, JAM-BとJAM-Cの共局在を二重免疫染色で検討した．矢頭は共局在を示す．Bars=50 μ m.

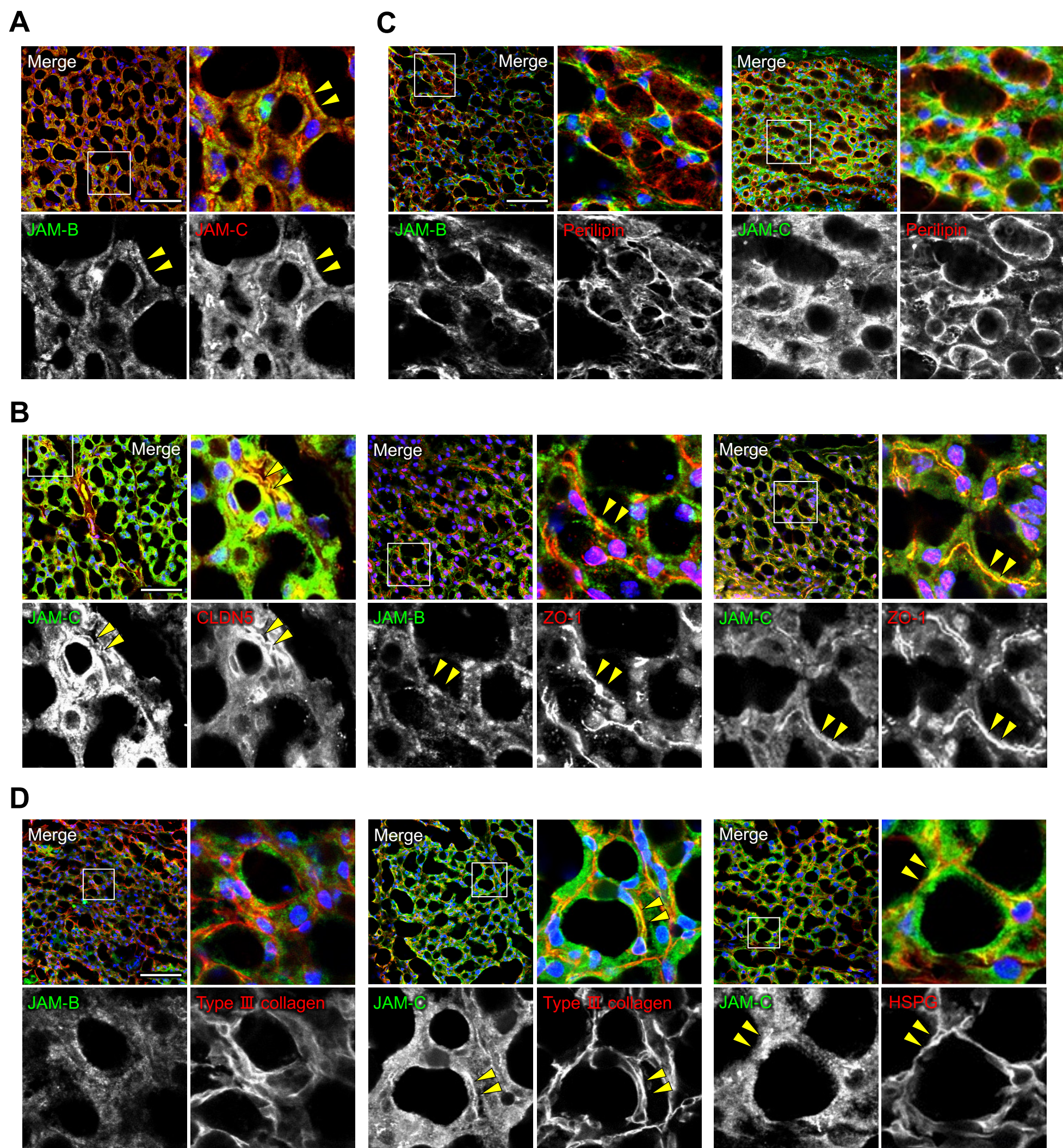


図2. JAM-B/Cは成体マウス脂肪組織の間質に分布している

(A-D) 成体マウス脂肪組織の二重免疫染色像. (A) JAM-BとJAM-Cの二重染色像. (B) JAM-B/Cと血管内皮細胞マーカーCLDN5あるいはZO-1との二重染色像. (C) JAM-B/Cと脂肪細胞表面マーカーPerilipinの二重染色像. (D) JAM-B/Cと細胞外基質であるIII型コラーゲンあるいはHSPGとの二重染色像. 矢頭は共局在を示す. Bars=50 μm.

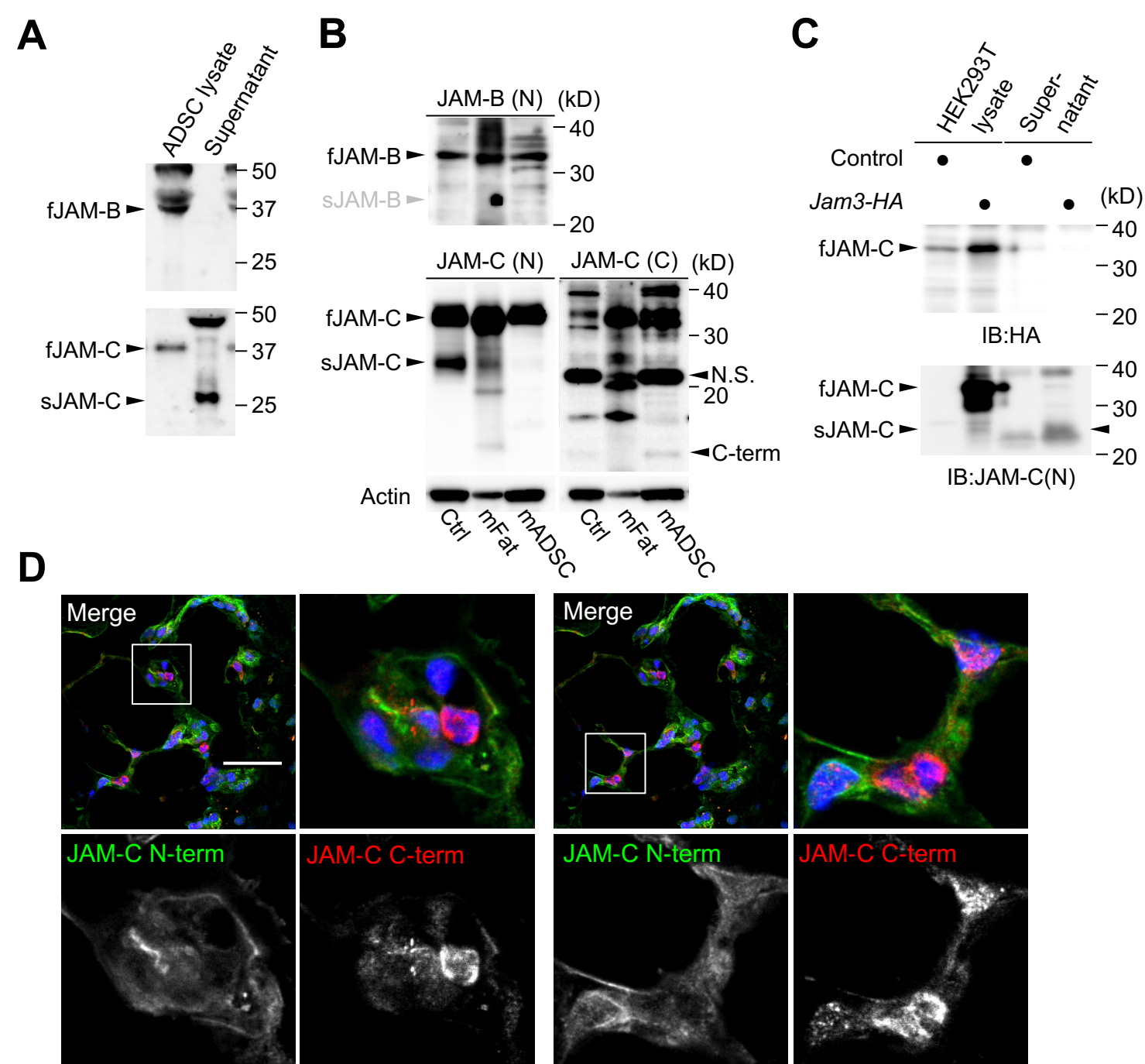


図3. JAM-Cは可溶化されて成体マウス脂肪組織の細胞外基質に沈着している

(A) ウェスタンブロットにてADSCの細胞抽出物と培養上清のJAM-B/Cを検出した。fJAM-BとfJAM-Cは全長のJAM-B/Cを、sJAM-Cは可溶化したJAM-Cをそれぞれ示す。(B) ウェスタンブロットにより成体マウス脂肪組織(mFat)におけるJAM-B/Cを検出した。陽性コントロール(Ctrl)としてマウス脾臓を用いた。(C) C末端をHAタグを融合したJAM-CをHEK293T細胞に遺伝子導入し、ウェスタンブロットにて細胞抽出物と培養上清におけるJAM-Cシグナルを解析した。(D) JAM-CのN末端とC末端を抗原とする抗体を用いた、成体マウス脂肪組織の二重免疫染色像。Bar=50μm.

図4

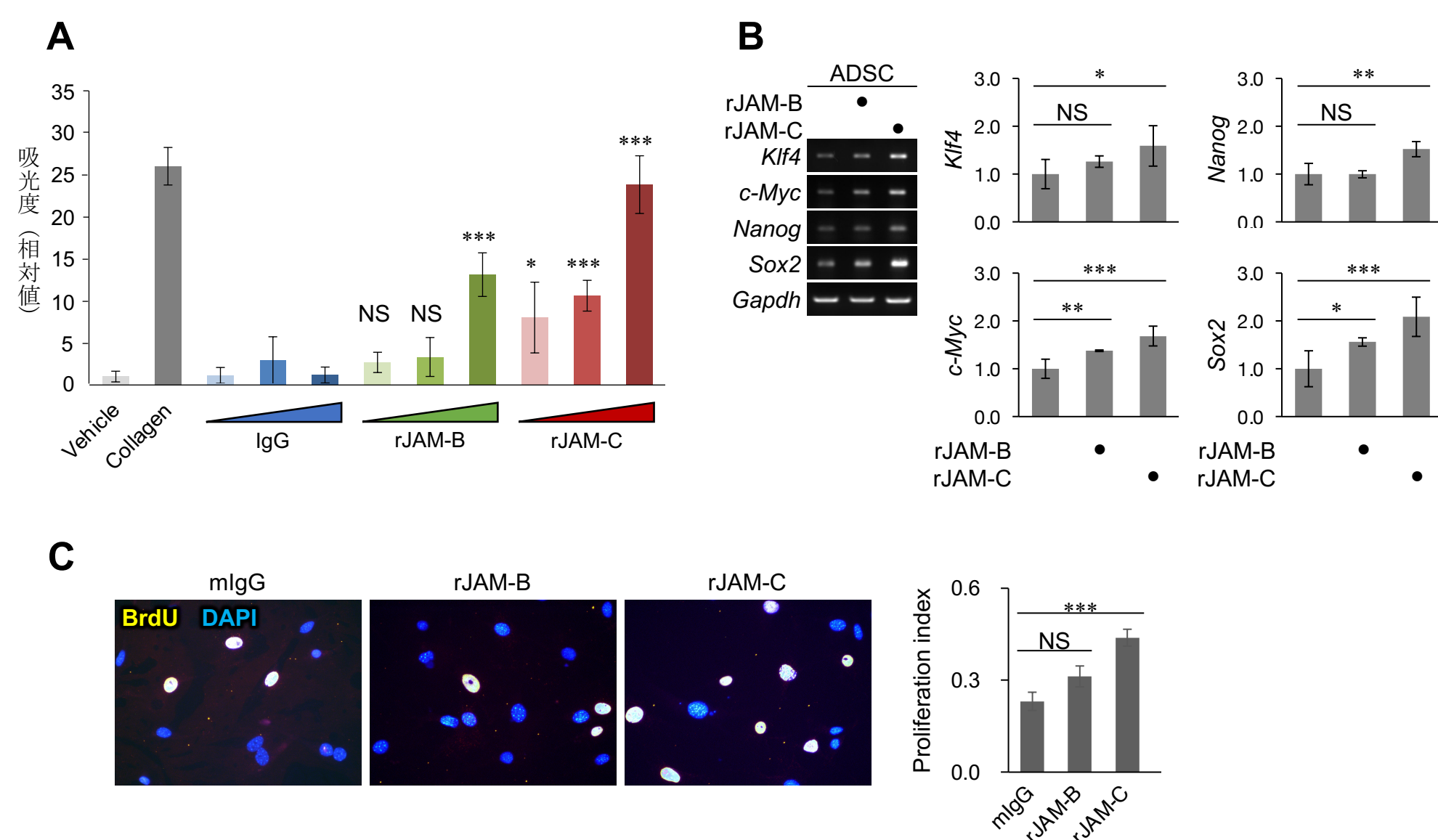


図4. リコンビナント可溶化JAM-CはADSCのニッチとして働く

(A) リコンビナント蛋白質を用いた接着アッセイ. リコンビナントJAM-B/C (rJAM-B/C)で培養皿を被覆してADSCを播種し, 30分後の接着細胞数を吸光度により定量した. 陽性コントロールとしてI型コラーゲンを, 陰性コントロールとしてマウスIgGを用いた. 溶媒処置群の値を1として, 相対値を棒グラフで表した. エラーバーは標準偏差を示す. N=5.

(B) rJAM-B/Cで培養皿を被覆した条件でADSCを維持培養し, 半定量的RT-PCRにて幹細胞マーカーの発現量を定量した. 左は独立して3回施行したものの代表例を示す. デンシトメトリで定量化し, 溶媒処置群の値を1とした場合の相対値を棒グラフとして右に示す.

(C) BrdUにより増殖期にある細胞の核を標識し, DAPI陽性細胞数で除して細胞増殖を評価した. エラーバーは標準偏差を表す. NS, not significant; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

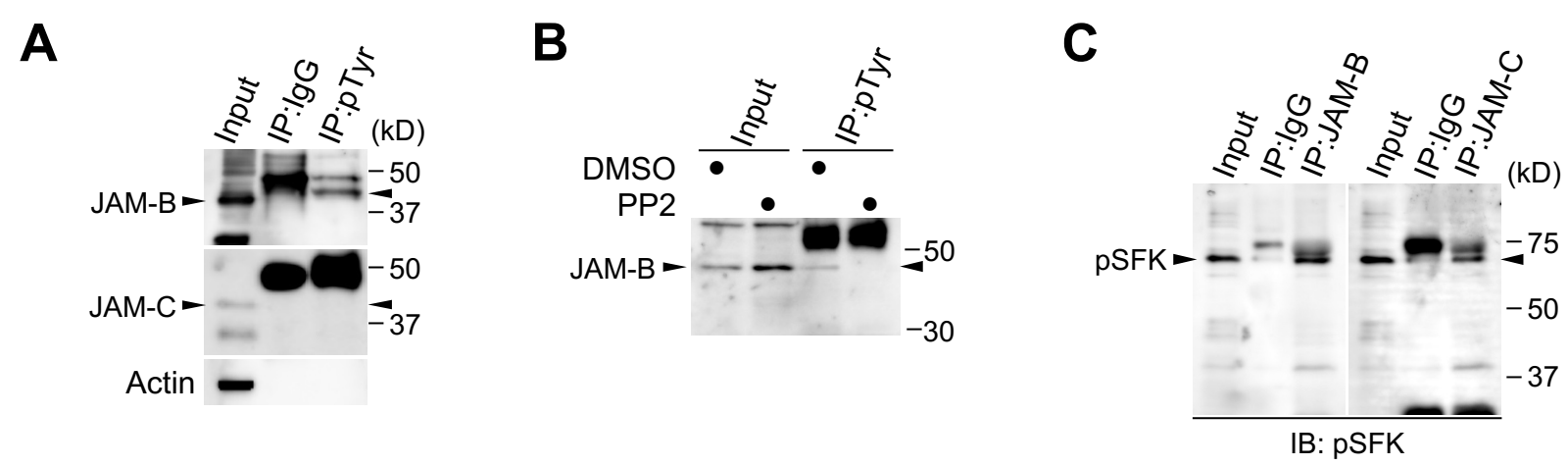


図5. JAM-BはSFKによりリン酸化される

(A,B) ADSCをpTyr抗体で免疫沈降し，JAM-B/Cをウエスタンブロットで検出した．(A) JAM-Bのみがリン酸化されている．(B) SFK阻害剤PP2でJAM-Bのリン酸化が阻害されている．インプットは0.5%．(C) JAM-B/C抗体でそれぞれ免疫沈降し，pSFK抗体でウエスタンブロットした．JAM-B/CはpSFKと蛋白質複合体を形成している．インプットは0.5%．

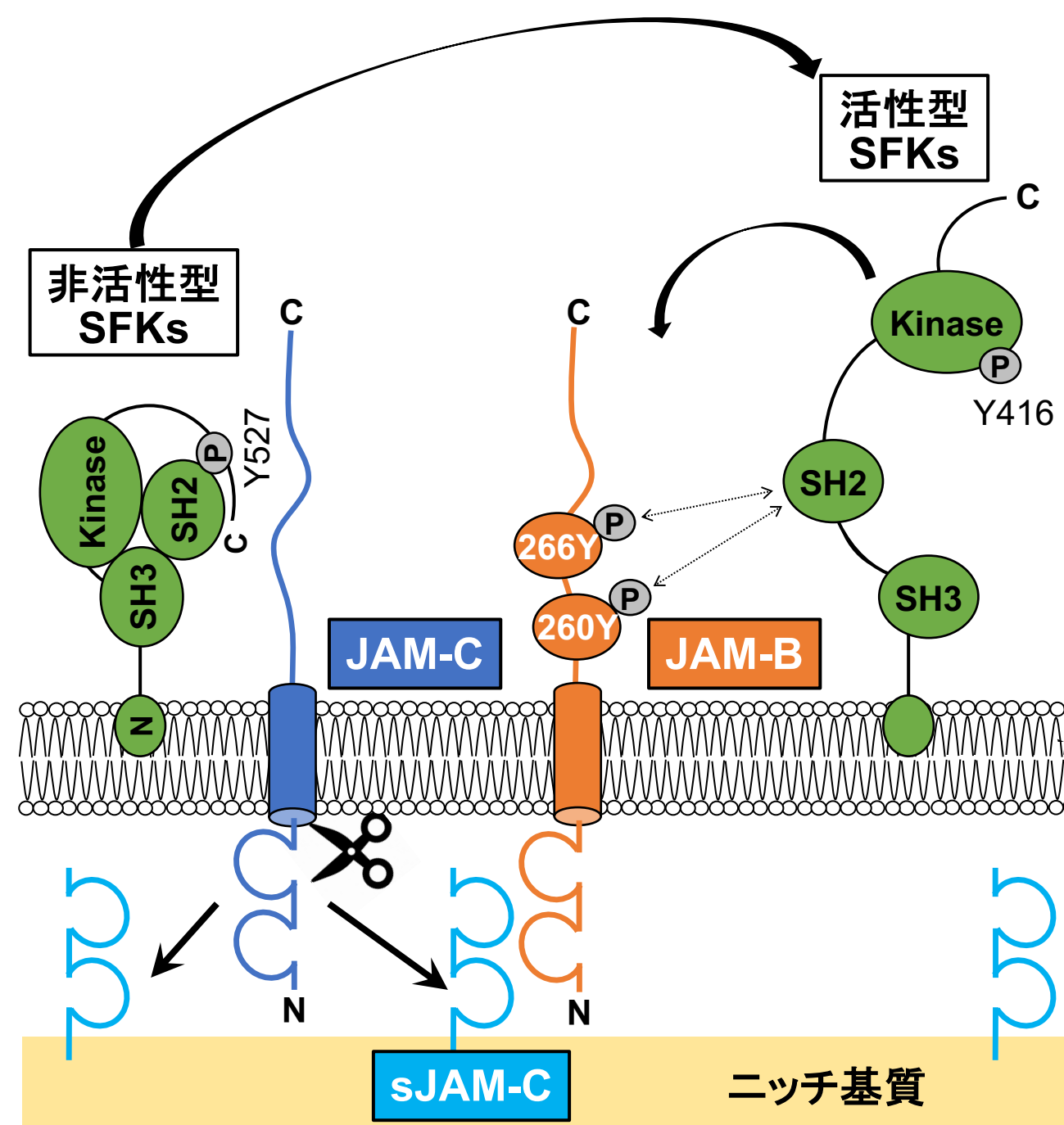


図6. JAM-BとsJAM-Cの細胞-基質間接着によるMSCsの細胞内シグナル活性化機構モデル

MSCsは細胞表面にJAM-B/Cを発現しており、このうちJAM-Cは細胞外ドメインの基部で切断されて可溶化体sJAM-Cとして放出され細胞外基質に沈着する。sJAM-Cはニッチ基質として機能し、MSCsのJAM-Bと会合を形成することでSFKsがリクルートされる。JAM-Bと結合したSFKsは活性化してJAM-Bをリン酸化するとともに、さらに下流へとシグナルを伝達してMSCsの幹細胞性を維持する。260Yと266Yは脊椎動物間で保存されたチロシン残基である。

表1：抗体一覽

Antibody	Type	Host	IHC	WB	Source
JAM-A	pAb	Rabbit		1:1000	Zymed Laboratories (36-1700)
JAM-B	mAb	Rat	1:100	1:2000	R&D Systems (MAB988)
JAM-C (N)	pAb	Goat	1:200	1:1000	R&D Systems (AF1213)
JAM-C (C)	pAb	Rabbit	1:200	1:1000	Thermo Fisher Scientific (40-9000)
CAR	pAb	Rabbit	1:50	1:500	Bioss (bs-2389R)
CLMP	pAb	Rabbit	1:100	1:1000	Gene Tex GTX51678)
Claudin-5	mAb	Mouse	1:300		Invitrogen (35-2500)
ZO-1	pAb	Rabbit	1:100		Invitrogen (61-7300)
Perilipin	pAb	Rabbit	1:100		abcam (ab3526)
Type III collagen	pAb	Rabbit	1:100		abcam (ab7778)
HSPG	mAb	Rat	1:300		MILLIPORE (MAB1948P)
Flag	mAb	Mouse		1:1000	MBL (M185-3L)
HA	mAb	Rat		1:1000	Roche (11867423001)
pSFK	mAb	Rabbit		1:1000	MILLIPORE (04-889)
Actin	mAb	Mouse		1:1000	Sigma-Aldrich (A2228)
Goat IgG (HRP)	pAb	Rabbit		1:2500	Dako (P0449)
Mouse IgG (HRP)	pAb	Sheep		1:10000	GE Healthcare (NA931)
Rabbit IgG (HRP)	pAb	Donkey		1:5000	GE Healthcare (NA934)
Rat IgG (HRP)	pAb	Goat		1:2500	GE Healthcare (NA935)
Goat IgG (Alexa Fluor 488)	pAb	Donkey	1:200		Life technologies (A11055)
Mouse IgG (Alexa Fluor 488)	pAb	Donkey	1:200		Life technologies (A21202)
Rabbit IgG (Alexa Fluor 488)	pAb	Donkey	1:200		Life technologies (A21206)
Rat IgG (Alexa Fluor 488)	pAb	Donkey	1:200		Life technologies (A21208)
Goat IgG (Cy3)	pAb	Donkey	1:200		Jackson Immuno Research (705-165-147)
Mouse IgG (Cy3)	pAb	Donkey	1:200		Jackson Immuno Research (705-165-151)
Rabbit IgG (Cy3)	pAb	Donkey	1:200		Jackson Immuno Research (705-165-152)
Rat IgG (Cy3)	pAb	Donkey	1:200		Jackson Immuno Research (705-165-150)

表2：プライマー一覧

Gene	Forward primer	Reverse primer	Product size (bp)
JAM-A (<i>F11r</i>)	AGCCAGATCACAGCTCCCTA	CATTGTCCTTCCGGGTCACA	672
JAM-B (<i>Jam2</i>)	TGGTCAATACCTGTGAAACACAAA	TGGACAATAATTGCTAAAAGGG	161
JAM-C (<i>Jam3</i>)	TGTGCAAGTGAAGCCAGTGA	AGTGGCACATCATTGCGGTA	138
JAM4 (<i>Igsf5</i>)	CCTTCCAGAAAAACGCAGCA	GTCTCCCGGGTGATTCCAAA	182
JAML (<i>Amica1</i>)	GATCGCGGTGGACTGTTCTT	GCCGTCCTTGACTCACTCTAC	351
CAR (<i>Cxadr</i>)	AACGATGTCAAGTCTGGCGA	TTCCGATCCATCCACGAAGC	171
CLMP (<i>Clmp</i>)	CCTCTTTCTCCAGTCGGTTTTTC	GGTTAGGGAGGAGAAGGCGA	90
ESAM (<i>Esam</i>)	AGACACCGTGTGTCCAACCTC	AGTCCCAGGAACAAAACCCG	108
Klf4 (<i>Klf4</i>)	GCGAACTCACACAGGCGAGAAACC	TCGCTTCCTCTTCCTCCGACACA	696
c-Myc (<i>Myc</i>)	TGACCTAACTCGAGGAGGAGCTGGAATC	AAGTTTGAGGCAGTTAAAATTATGGCTGAAGC	170
Nanog (<i>Nanog</i>)	AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG	CAACCACTGGTTTTTCTGCCACCG	364
Sox2 (<i>Sox2</i>)	TAGAGCTAGACTCCGGGCGATGA	TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA	297
GAPDH (<i>Gapdh</i>)	ATGTGTCCGTCGTGGATCTGA	TTGAAGTCGCAGGAGACAACCT	145